

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16030

研究課題名（和文）疼痛治療に向けたAnoctamin1阻害活性を有する生薬・漢方薬及び活性成分探索

研究課題名（英文）Screening for anoctamin1 inhibitor from Japanese traditional medicines

研究代表者

中森 俊輔（Nakamori, Shunsuke）

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：30631642

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：疼痛関連分子のTransient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) 阻害剤開発が進められているが、副作用のため開発には至っていない。近年、TRPV1の疼痛シグナルを増強するCa²⁺活性化Cl⁻イオンチャネルAnoctamin 1 (ANO1) が報告された。ANO1阻害剤は直接TRPV1を阻害しないため、TRPV1阻害剤による副作用を回避し得る可能性がある。本研究では、ヒトANO1安定発現細胞株による評価系構築、および漢方薬のANO1阻害活性を評価した。その結果、ANO1阻害活性の報告がある半夏瀉心湯を含む18種類が阻害活性を有することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果の学術的意義は、ANO1阻害剤の探索をすることによって、間接的なTRPV1阻害様作用を有する鎮痛薬の探索に貢献することができ、さらに有害事象により達成されていないTRPV1阻害薬開発に対する代替案の一つになる点である。さらに、社会的意義については、評価対象を漢方薬としたことで、既に臨床応用されていることから新薬と比較して副作用など安全面で優れ、迅速な臨床応用が期待できる。また、長期的には、新規鎮痛薬としてANO1阻害作用を有する生薬・漢方薬のリポジショニング（効能効果追加）や植物エキスイ医薬品の開発、活性成分をリードとした強力なANO1阻害薬の創薬研究などに貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Development of inhibitors of Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), a pain-related molecule, has been underway but has yet to be developed due to side effects. Recently, Anoctamin 1 (ANO1), a Ca²⁺-activated Cl⁻ ion channel that potentiates TRPV1 pain signaling, has been reported; ANO1 inhibitors do not directly inhibit TRPV1 and may avoid the side effects of TRPV1 inhibitors. In this study, we constructed an evaluation system using a human ANO1 stable-expressing cell line and evaluated the ANO1 inhibitory activity of Kampo formulations. As a result, 18 Kampo formulations have inhibitory activity, including Hangeshashinto, which has been reported to have ANO1 inhibitory activity.

研究分野：生薬、漢方薬、天然物化学

キーワード：Anoctamin1 漢方薬 生薬 鎮痛

1. 研究開始当初の背景

痛みの原因は様々あるため、痛みの治療において既存の鎮痛薬(オピオイドや非ステロイド性鎮痛作用など)では効果が不十分である事が多く、新規鎮痛薬の開発が求められている。そこで、唐辛子のカプサイシンや 43 以上の熱によって活性化され、痛みを惹起する非選択的陽イオンチャネルである transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の阻害剤開発が行われている。しかし、TRPV1 阻害剤は臨床研究において深部体温異常や熱痛に対する感受性の低下などの有害事象から未だ開発には至っていない(Cui M., *et al.*, Adv. Protein Chem. Struct. Biol., **104**, 81-145, 2016)。一方で、TRPV1 活性化剤の脱感作による鎮痛作用も知られており、高濃度カプサイシン含有の外用剤が用いられている(Schumacher M., *et al.*, Prog. Drug Res., **68**, 105-123, 2014)。申請者らも、これまでに生薬の麻黄エキ스가 TRPV1 活性化を介した脱感作による鎮痛作用を報告してきた(Nakamori S., *et al.*, J. Nat. Med., **71**, 105-113, 2017)。しかし、TRPV1 活性化剤は神経毒性や激痛などを生じるため、使用制限やコンプライアンス低下が問題となる。

最近になり、Ca²⁺活性化 Cl⁻イオンチャネルである Anoctamin1 (ANO1) が侵害性熱刺激(44 以上)で活性化する疼痛関連分子であることが報告された(Cho H., *et al.*, Nature Neurosci., **15**, 1015-1021, 2012)。したがって、ANO1 阻害作用を有する化合物は新規鎮痛薬の候補分子になると考えられている。特に ANO1 は、TRPV1 イオンチャネルの活性化による神経興奮を増幅することで疼痛に関与している点が興味深く、ANO1 阻害剤は TRPV1 阻害様作用も有することが考えられている(Takayama Y., *et al.*, PNAS., **112** (16), 5213-5218, 2015)。したがって、ANO1 阻害剤は間接的に TRPV1 による神経興奮を阻害することから、TRPV1 阻害剤による有害事象を回避できる鎮痛薬及びシーズ化合物になり得る可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究計画では ANO1 阻害作用を有する生薬・漢方薬やその有効成分を見出すために、効率的な *in vitro* におけるスクリーニング系の構築、ANO1 阻害作用を有する生薬・漢方薬及び活性成分の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト ANO1 安定発現細胞株の樹立

hANO1 の終止コドン除去した cDNA を導入した発現用ベクター (hANO1/pEF5/FRT/V5-DEST) を購入した。Lipofectamine3000 を用いて pOG44 と共に Flp-In293 細胞株にトランスフェクションした。ハイグロマイシン B を含む選択培地で継代培養を行い、C 末端に V5 タグを付加した hANO1 安定発現細胞株 (hANO1/Flp-In293) を得た。実験には、ウエスタンブロッティングにより hANO1 の発現が確認され、カルシウムイオノフォアであるイオノマイシンによる応答が良かった細胞株を選択し実験に用いた。

(2) 膜電位変化依存的蛍光強度変化の測定

各細胞を 6×10^4 cells/well の密度で poly-D-lysine でコートした 96well ブラックプレート (greiner bio-one) に播種した。24 時間培養後、培地を Membrane potential assay kit の Blue component A (Molecular Devices) を溶解させた Hank's balanced salt solution (HBSS; ニッスイ) バッファー [with 20mM HEPES (同仁化学), pH 7.4] と交換し、37、5% CO₂ で 30 分間インキュベーションをした。蛍光強度の測定は Cl⁻の移動に伴う膜電位依存的な蛍光強度変化を FlexStation3 で経時的に測定した。励起波長は 530 nm、蛍光波長は 565 nm とした。データ解析は Soft Max Pro 5.4 を用いた。

(3) 漢方薬の ANO1 阻害活性評価

医療用漢方エキス製剤を購入し実験に供した。各エキス製剤(賦形剤込)の終濃度は、1 回服用量を水 100 mL で服用したと仮定した場合の 1/100 の濃度になる様に DMSO 溶液を HBSS バッファーで希釈した (DMSO 終濃度 0.1-0.2%)。hANO1 活性化には 0.1 μ M イオノマイシン、阻害剤には 1 μ M Ani9 を用いた。

4. 研究成果

(1) hANO1/Flp-In293 細胞株の樹立

抗生物質含有選択培地で培養した結果、14 株を得ることができ、そのうちイオノマイシンに対する蛍光強度変化が高かったものを選択した（図 1）。選択した hANO1/Flp-In293 に対して、イオノマイシンの用量反応を評価したところ、イオノマイシンの濃度依存的に膜電位依存的な蛍光強度変化が確認された（図 2A、 $EC_{50}=0.049 \mu M$ ）。また、ANO1 阻害剤の Ani9 は濃度依存的に $0.1 \mu M$ イオノマイシンに対する反応を阻害した（図 2B、 $IC_{50}=0.11 \mu M$ ）。以上より、イオンチャネルとして機能することを確認した。また、ウエスタンブロッティング解析では、V5 エピトープタグに対する抗体で検出したところ、hANO1/Flp-In293 において 110~150 kDa の範囲に明瞭なバンドが確認できた（図 2C）。

(2) 漢方エキス製剤の hANO1 阻害作用の評価

漢方エキス製剤 100 種類以上をスクリーニングしたところ、既に ANO1 阻害作用の報告がある半夏瀉心湯と同程度以上の阻害作用を有するものが 17 種類確認できた（図 3）。半夏瀉心湯は口内炎治療に用いられるが、今回評価した濃度は実際に服用するときの 1/100 であったことから、半夏瀉心湯の鎮痛作用の 1 つである可能性が考えられる。また、hANO1 阻害作用に寄与する可能性のある生薬を多変量解析（独立変数；生薬の構成量、従属変数；hANO1 阻害活性）して推定したところ、阻害作用の報告のない生薬を含む数種類の生薬の寄与が推定された。今後、これらの漢方薬や生薬、その成分について詳細に解析を進めていく。

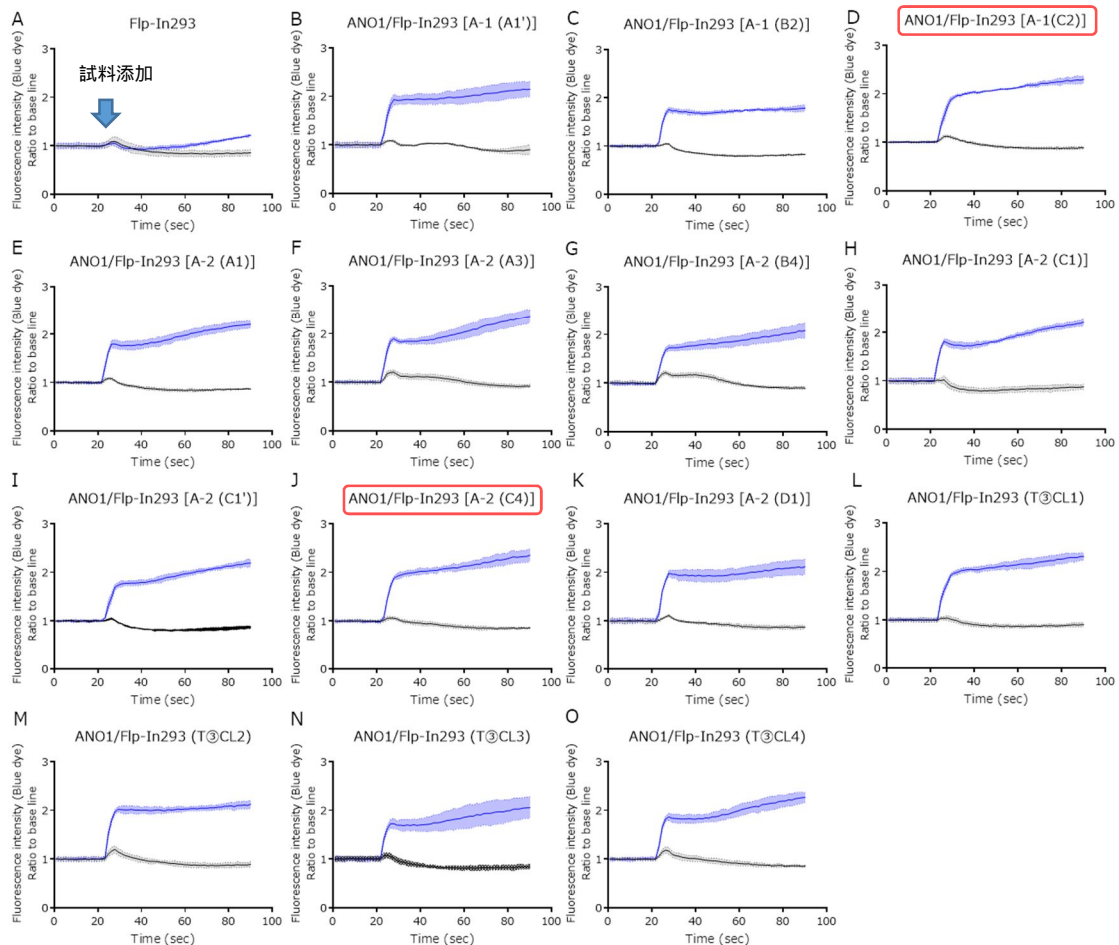


図 1. hANO1/Flp-In293 細胞株における膜電位依存的な蛍光強度変化の比較

A; Flp-In293（非発現細胞株） B-0; hANO1/Flp-In293、データは平均±SD（n=3）で表した。また、灰色のラインは DMSO、青色のラインは $5 \mu M$ イオノマイシン処理による経時的な蛍光強度変化をしめす。

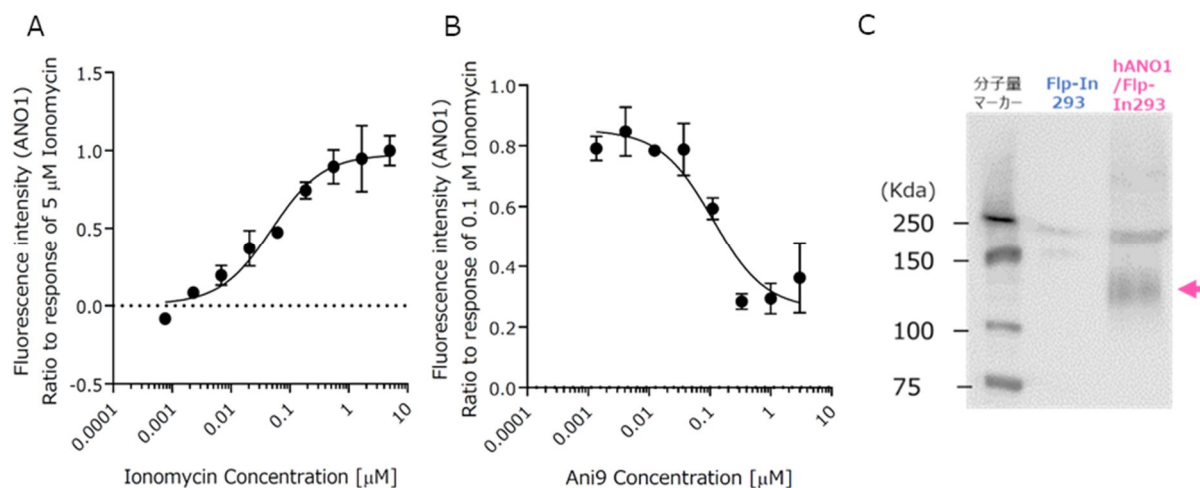


図 2. ANO1 機能解析およびウエスタンブロッティングによるタンパク質発現解析

A; hANO1/Flp-In293 におけるイオノマイシンの濃度反応曲線、B; 典型的な阻害剤の Ani9 の濃度反応曲線、データは平均 $\pm$ SD (n=3) で表した。C; バンド (桃色矢印) は検出された V5 タグと融合した hANO1 タンパク質を示す。

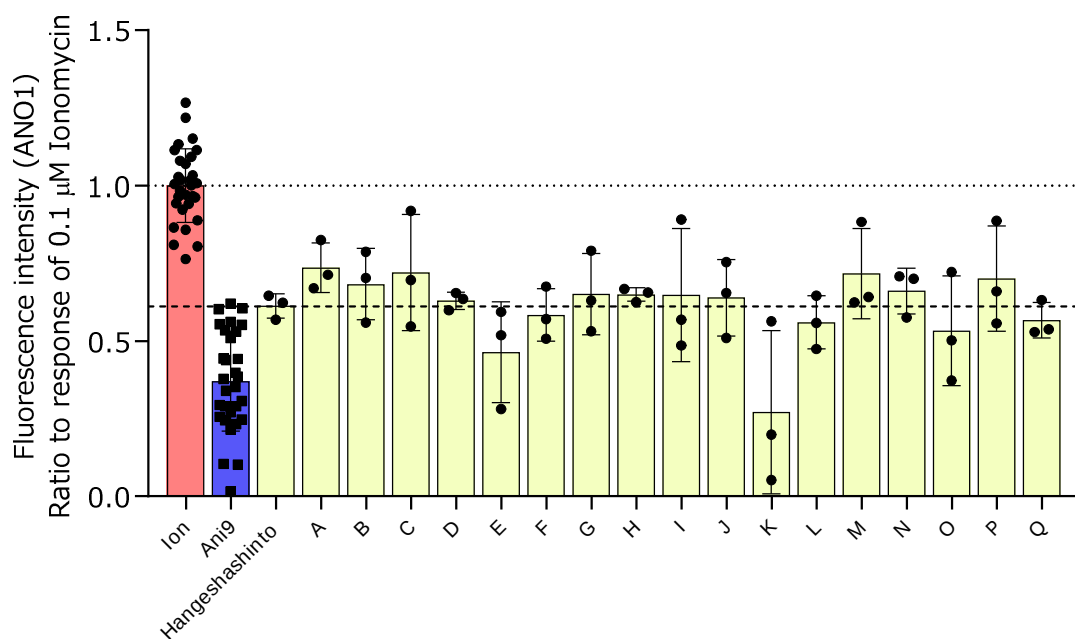


図 3. hANO1 阻害作用をしめた漢方エキス製剤

データは平均 $\pm$ SD で表した。点線は半夏瀉心湯処理による膜電位依存的な蛍光強度を示した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------